VISIT…

LANZAROTE

Caliente.com

Е.Л.СТЫСКИН, Л.Б.ИЦИКСОН, Е.В.БРАУДЕ

Практическая Высокоэффективная Жидкостная ХРОМАТОГРАФИЯ

Москва.
1986

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие……………………………………………………………………………………6
Введение…………………………………………………………………………………………7

ГЛАВА 1. ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ВЭЖХ……………………..8

1.1. Эффективность и селективность…………………………………………………………8
1.2. Размывание в колонке и вне ее…………………………………………………………..12
1.3. Удерживание и сила растворителя……………………………………………………..14
1.4. Размер частиц сорбента, проницаемость и эффективность……………………………..14

ГЛАВА 2. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВЭЖХ ПО МЕХАНИЗМУ РАЗДЕЛЕНИЯ……..16

2.1. Адсорбционная хроматография…………………………………………………………16
2.1.1. Адсорбционная хроматография на силикагеле………………………………………..17
2.1.2. Адсорбционная хроматография на оксиде алюминия………………………………….20
2.1.3. Недостатки адсорбционной хроматографии, ограничивающие ее использование……………………………………………………………………………..20
2.2. Распределительная хроматография……………………………………………………..21
2.2.1. Нормально-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами…..22
2.2.2. Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами…..25
2.2.3. Распределительная хроматография с нанесенными фазами………………..31
2.3. Ионообменная хроматография…………………………………………………………32
2.3.1. Основы метода……………………………………………………………………………32
2.3.2. Выбор подвижной фазы и условий разделения…………………………………………37
2.3.3. Ионная хроматография……………………………………………………………………38
2.3.4. Практические рекомендации………………………………………………………………39
2.4. Эксклюзионная хроматография…………………………………………………………..41
2.4.1. Основные понятия…………………………………………………………………………..41
2.4.2. Особенности аппаратуры…………………………………………………………………..44
2.4.3. Выбор сорбента……………………………………………………………………………..45
2.4.4. Выбор растворителя………………………………………………………………………...47
2.4.5. Исследование полимеров…………………………………………………………………49
2.4.6. Другие области применения………………………………………………………………58

ГЛАВА 3. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЭЖХ……………………………………………60

3.1. Препаративная ВЭЖХ……………………………………………………………………..60
3.2. Микроколоночная ВЭЖХ…………………………………………………………………63
3.3. ВЭЖХ с градиентом состава растворителя……………………………………………66
3.4. ВЭЖХ с получением производных до и после колоночного разделения………………69
3.4.1. Получение производных до введения вещества в колонку……………………70
3.4.2. Получение производных после разделения в колонке…………………………………71
3.5. Ион-парная хроматография………………………………………………………………75
3.6. Лигандообменная хроматография………………………………………………………..83
3.7. Определение микропримесей……………………………………………………………..85
3.7.1. Общие положения…………………………………………………………………………...85
3.7.2. Предварительная подготовка образца и его ввод в хроматограф……………………85
3.7.3. Разрешающая способность колонки……………………………………………………..86
3.7.4. Детекторы……………………………………………………………………………………..86
3.7.5. Калибровочные графики……………………………………………………………………87

ГЛАВА 4. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ……………………………………………………………..88

4.1. Силикагель, его структура и химия поверхности……………………………………89
4.2. Оксид алюминия…………………………………………………………………………90
4.3. Привитые сорбенты на основе силикагеля для нормально-фазной и обращенно-фазной хроматографии……………………………………………………………91
4.4. Полимерные сорбенты для распределительной хроматографии……………..101
4.5. Сорбенты для эксклюзионной хроматографии……………………………………103
4.5.1. Полужесткие гели………………………………………………………………….104
4.5.2. Жесткие гели…………………………………………………………………………107
4.6. Сорбенты для ионообменной хроматографии……………………………………111

ГЛАВА 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ, СОРБЕНТОВ И КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ……………..112

5.1. Получение узких фракций для ВЭЖХ из силикагеля для ТСХ и промышленного силикагеля КСК-2…………………………………………………………..113
5.2. Суспензионные методы приготовления колонок для ВЭЖХ…………………..115
5.3. Заполнение колонок «сухим» методом……………………………………………..122
5.4. Тестирование и оценка качества приготовленных колонок…………………..123
5.5. Хранение, регенерация и ремонт колонок для ВЭЖХ……………………………123

ГЛАВА 6. ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ…………………………………………………127

6.1. Основные требования к растворителям……………………………………………128
6.2. Элюирующая сила растворителя и элюотропные ряды…………………………130
6.3. Смеси растворителей……………………………………………………………………131
6.4. Селективность растворителя…………………………………………………………132
6.5. Очистка растворителей для ВЭЖХ…………………………………………………..132

ГЛАВА 7. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОДБОРА УСЛОВИИ РАЗДЕЛЕНИЯ…………….136

ГЛАВА 8. АППАРАТУРА ДЛЯ ВЭЖХ…………………………………………………………138

8.1. Насосы……………………………………………………………………………………..139
8.2. Устройства для формирования градиента………………………………………….143
8.3. Инжекторы…………………………………………………………………………………147
8.4. Детекторы для ВЭЖХ……………………………………………………………………150
8.4.1. Фотометры для работы в ультрафиолетовом и видимом диапазонах……….151
8.4.2. Спектрофотометрические детекторы………………………………………………152
8.4.3. Рефрактометрические детекторы……………………………………………………154
8.4.4. Флуориметрические детекторы………………………………………………………156
8.4.5. Другие детекторы……………………………………………………………………..157
8.5. Системы регистрации и обработки данных…………………………………………160
8.5.1. Самописцы…………………………………………………………………………….160
8.5.2. Интеграторы…………………………………………………………………………….160
8.6. Вспомогательные устройства для ВЭЖХ……………………………………………161
8.6.1. Сосуды для подвижной фазы…………………………………………………………161
8.6.2. Проточные фильтры……………………………………………………………………162
8.6.3. Устройства для измерения давления………………………………………………163
8.6.4. Демпферы………………………………………………………………………………..163
8.6.5. Шприцы для ввода проб……………………………………………………………….164
8.6.6. Измерители скорости потока…………………………………………………………165
8.6.7. Термостаты колонок…………………………………………………………………….165

8.7. Конструкционные материалы для ВЭЖХ, требования к их химической стойкости и прочности……166

ГЛАВА 9. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ……169

9.1. Идентификация веществ нехроматографическими методами……172
9.2. Спектральный анализ непосредственно в хроматографической системе……175

ГЛАВА 10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ……175

10.1. Хроматографическое разделение……175
10.2. Измерение площадей или высот пиков……177
10.3. Расчет количественного состава смесей (методы калибровки)……178
10.4. Интерпретация полученных результатов……180

ГЛАВА 11. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА В ВЭЖХ……181

11.1. Сборка хроматографической системы……181
11.1.1. Соединительные линии……182
11.1.2. Соединители и уплотняющие муфты……183
11.1.3. Резка и обработка концов капиллярных трубок……186
11.1.4. Особенности присоединения детектора……187
11.1.5. Запуск и герметизация системы……188
11.1.6. Типичные ошибки при сборке системы……189
11.2. Подготовка растворителя и пробы……189
11.2.1. Дегазация растворителя……190
11.2.2. Особенности работы с водными растворителями……191
11.2.3. Подготовка раствора пробы……191
11.2.4. Подготовка растворов полимерных образцов……191
11.3. Выбор варианта ВЭЖХ для анализа……192

ГЛАВА 12. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РЕМОНТУ, НАЛАДКЕ И ОБСЛУЖИВАНИЮ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ……195

Основные поставщики аппаратуры……200

Библиографический список……202

ПРИЛОЖЕНИЯ……205

1. Свойства сорбентов для ВЭЖХ
1.1. Свойства адсорбентов и привитых сорбентов для ВЭЖХ
1.2. Свойства ионообменных смол для ВЭЖХ
1.3. Свойства ионообменных силикагелей для ВЭЖХ
1.4. Свойства полужестких сорбентов для эксклюзионной ВЭЖХ
1.5. Свойства жестких сорбентов для эксклюзионной ВЭЖХ
2. Свойства основных растворителей для жидкостной хроматографии
3. Применимость растворителей для эксклюзионной хроматографии различных полимеров
4. Константы *Кц* и *а* в уравнении Марка — Куна — Хаувинка

ПРЕДИСЛОВИЕ

Бурное развитие жидкостной хроматографии в последние 10 лет обусловлено, главным образом, интенсивной разработкой теоретических основ и практическим использованием ее высокоэффективного варианта, а также созданием и промышленным выпуском необходимых сорбентов и аппаратуры.

Отличительной особенностью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является использование сорбентов с размером зерен 3-10 мкм, что обеспечивает быстрый массоперенос при очень высокой эффективности разделения.

В настоящее время ВЭЖХ по темпам развития вышла на первое место среди инструментальных методов, обогнав даже газовую хроматографию. Важнейшее преимущество ВЭЖХ по сравнению с газовой хроматографией — возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам, например, по температурам кипения или молекулярной массе.

Сегодня ВЭЖХ представляет собой хорошо оформленный инструментальный метод, который широко применяют в самых различных областях науки и техники. Особенно велико его значение в таких важнейших областях, как биохимия, молекулярная биология, контроль загрязнений окружающей среды, а также в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности.

По теории и практике ВЭЖХ за рубежом опубликовано более десятка монографий, часть которых переведена в СССР. Однако в большинстве из них, так же как в изданных до 1985г. монографиях советских авторов, многие вопросы практического характера либо рассмотрены очень кратко, либо содержащаяся в них информация устарела и не соответствует современному уровню развития метода. Интенсивное развитие ВЭЖХ стимулирует непрерывное совершенствование аппаратуры, разработку и выпуск новых сорбентов, которые позволяют хроматографисту решать всё более сложные задачи.

Данная книга написана, главным образом, для начинающих хроматографистов. Авторы стремились изложить в простой и доступной форме основы наиболее распространенных вариантов ВЭЖХ с учетом последних достижений метода. Особое внимание уделено практическим вопросам, связанным со спецификой техники современного хроматографического эксперимента и его методическими аспектами.

Детально рассмотрены особенности приготовления высокоэффективных колонок, их регенерации и ремонта, а также сборки хроматографических систем. Специальный раздел книги посвящен наладке, обслуживанию и ремонту аппаратуры.

В приложениях приведены характеристики современных сорбентов, растворителей и наиболее широко используемых приборов для ВЭЖХ, а также некоторые другие полезные сведения.

Авторы надеются, что данное руководство поможет исследователям, независимо от их основной специальности, освоить и грамотно использовать в работе этот мощный и многогранный аналитический метод.

Введение и главы 1, 5, 7, 12, раздел 11.3, приложения 5, 6 и материал по адсорбционной и распределительной хроматографии в главах 2, 4 и приложениях написаны Е. Л. Стыскиным, главы 6, 11, приложения 2-4, 7 и материал по эксклюзионной хроматографии в главах 2, 4 и приложениях — Л. Б. Ициксоном, главы 9, 10 и материал по ионообменной хроматографии в главах 2 и 4 и приложениях — Е. В. Брауде, глава 3 — совместно Е. Л. Стыскиным и Е. В. Брауде, а глава 8 — совместно Е. Л. Стыскиным и Л. Б. Ициксоном.

Авторы будут признательны за полезные критические замечания и советы.

ВВЕДЕНИЕ

Современная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — один из эффективных методов анализа и разделения сложных смесей. Она как метод была открыта в 1903 г. русским ученым-ботаником М.С.Цветом, который использовал для разделения растительных пигментов на их составляющие колонки, заполненные порошком мела [1]. При вымывании пигментов петролейным эфиром они перемещались вдоль колонки, разделяясь при этом на кольца разного цвета. Метод оказался очень удобным и был позднее назван Цветом хроматографией (цветописью).

Предложенный Цветом метод жидкостной хроматографии был незаслуженно забыт и почти не применялся более 30 лет. Быстрое развитие в 50-х годах газовой хроматографии, за разработку которой Мартину и Синджу была присуждена в 1952 г. Нобелевская премия, создание удачных конструкций детекторов и узлов газовых хроматографов стимулировали и рост интереса к жидкостной инструментальной хроматографии. Если в 50-е и 60-е годы методы хроматографии в тонких слоях (бумажная и тонкослойная) в значительной мере заменили колоночную как более быстрые, удобные и простые, то 70-е годы характеризуются гигантским прогрессом именно высокоэффективной (инструментальной) жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Она в настоящее время не только в большой мере вытеснила классическую колоночную, бумажную и тонкослойную хроматографию, но и обогнала газовую хроматографию по темпам развития. Быстрый рост применения ВЭЖХ связан с освоением и серийным выпуском как отдельных узлов (насосов, демпферов, инжекторов, детекторов), так и комплектных жидкостных хроматографов. Немалую роль сыграли также разработка теоретических основ ВЭЖХ, организация выпуска высокочистых растворителей и химикатов для ВЭЖХ. Особенно следует отметить организацию выпуска узкодисперсных сорбентов зернением от 3 до 10 мкм на основе силикагеля, в том числе и с химически привитыми неподвижными фазами, и разработку способов заполнения ими высокоэффективных колонок для ВЭЖХ.

Причин быстрого развития ВЭЖХ несколько. Прежде всего следует назвать большой диапазон молекулярных масс веществ, с которыми можно работать: от нескольких единиц до десятков миллионов, что существенно шире, чем в газовой хроматографии. Кроме того, мягкость условий ВЭЖХ (почти все разделения можно проводить при температурах, близких к комнатной, при отсутствии контакта с воздухом) делает ее особенно пригодным, а зачастую единственным методом исследования лабильных соединений, в частности, биологически активных веществ и биополимеров. Эффективность разделения, которую уже сейчас дает ВЭЖХ (до 150000 т. т. на 1 м), существенно превосходит достигнутую в газовой хроматографии (ГХ). Скорость анализа методом ВЭЖХ высокая: обычно разделение сложной смеси занимает несколько минут. ВЭЖХ является таким же точным количественным методом, как и ГХ. Метод ВЭЖХ дает возможность препаративно выделить из сложной смеси в мягких условиях чистые вещества, которые можно далее исследовать другими физико-химическими методами. Наконец, чувствительность, достигаемая в ВЭЖХ, в ряде случаев превосходит чувствительность в ТХ, а высокоселективные детекторы позволяют определять микроколичества веществ в сложных смесях.

Метод ВЭЖХ находит широкое применение в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, биотехнология, медицина, пищевая промышлен-ность, охрана окружающей среды, производство лекарственных препаратов и во многих других.

По масштабу ВЭЖХ делится на микроколоночную (колонки диаметром менее 2 мм), аналитическую (2-6 мм), полупрепаративную (7-10 мм), препаративную (10-40 мм) и крупномасштабную препаративную (более 40 мм). Хотя это деление достаточно условно, тем не менее оно очень удобно, так как в зависимости от поставленной задачи требования к насосам, инжекторам, сорбенту и детекторам заметно меняются. Препаративные разделения можно проводить, например, на аналитических и даже микроколонках, а анализы — на полупрепаративных, однако эффективность такой

работы будет низкой. Правильно выбранный масштаб работы позволит наиболее экономно расходовать дорогие растворители и сорбенты и получать при этом максимальный выигрыш в чувствительности, времени анализа или количестве выделенного вещества.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную и эксклюзионную. В адсорбционной хроматографии разделение веществ, входящих в смесь и движущихся по колонке в потоке растворителя, происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться на поверхности адсорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной ВЭЖХ разделение происходит за счет разной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе, как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и подвижной фазе — растворителе. Этот метод разделения наиболее популярен, особенно в случае, когда привитая фаза представляет собой неполярный алкильный остаток от C_8 до C_{18}, а подвижная фаза более полярна, например смесь метанола или ацетонитрила с водой. Этим вариантом так называемой обращенно-фазной (или обратно-фазной, или с обращением фаз) хроматографии в настоящее время проводят около двух третей разделений в ВЭЖХ. Не совсем удачный, но общепринятый термин «обращенно-фазная ВЭЖХ» произошел от обратного, по сравнению с таковым в классическом адсорбционном варианте, соотношения полярности сорбента и растворителя: полярный сорбент и неполярная подвижная фаза для адсорбционной и, наоборот, неполярный сорбент и полярная подвижная фаза для обращенно-фазного варианта распределительной хроматографии. В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциировавшие на катионы и анионы в растворе, разделяются при движении через сорбент, на поверхности которого привиты катионные или анионные центры, способные к обмену с ионами анализируемых веществ за счет их разной скорости обмена. В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры носителя. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (наибольшей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор носителя. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры сорбента.

Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное — распределительными, и наоборот. При этом чем больше различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, по молекулярной массе, поляризуемости и др., тем больше вероятность для каких-то веществ неожиданно большого проявления другого механизма разделения.

Дополнительные сведения по теории и практике ВЭЖХ можно найти в работах [2-8].

ГЛАВА 1
ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ВЭЖХ

Процесс хроматографического разделения очень сложен, тем не менее его отдельные стадии могут быть смоделированы и представлены в виде уравнений, достаточно точно и верно отражающих реальный процесс. Без знания того, что такое удерживание, эффективность, селективность, нагрузочная емкость, невозможно подойти к решению практических задач по ВЭЖХ, постоянно возникающих перед исследователем независимо от того, в какой области он работает.

1.1. ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ

Хроматография — это метод разделения компонентов смеси, основанный на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами,

одна из которых неподвижна, а другая подвижна. Компоненты образца движутся по колонке, когда они находятся в подвижной фазе, и остаются на месте, когда находятся в неподвижной фазе. Чем больше сродство компонента к неподвижной фазе и чем меньше — к подвижной, тем медленнее он движется по колонке и тем дольше в ней удерживается. За счет различия в сродстве компонентов смеси к неподвижной и подвижной фазам достигается основная цель хроматографии — разделение за приемлемый промежуток времени смеси на отдельные полосы (пики) компонентов по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой.

Из этих общих представлений ясно, что хроматографическое разделение возможно только в том случае, если компоненты образца, попадая в колонку при вводе пробы, во-первых, будут растворены в подвижной фазе и, во-вторых, будут взаимодействовать (удерживаться) с неподвижной фазой. Если при вводе пробы какие-то компоненты находятся не в виде раствора, они будут отфильтрованы и не будут участвовать в хроматографическом процессе. Точно так же компоненты, не взаимодействующие с неподвижной фазой, пройдут через колонку с подвижной фазой, не разделяясь на компоненты.

Примем условие, что какие-то два компонента растворимы в подвижной фазе и взаимодействуют с неподвижной фазой, т.е. хроматографический процесс может протекать без нарушений. В этом случае после прохождения смеси через колонку можно получить хроматограммы вида а, б или в (рис. 1.1). Эти хроматограммы иллюстрируют хроматографические разделения, отличающиеся эффективностью (а и б) при равной селективности и селективностью (б и в) при равной эффективности.

Эффективность колонки тем выше, чем уже пик получается при том же времени удерживания. Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок (ЧТТ) *N*: чем выше эффективность, тем больше ЧТТ, тем меньше расширение пика

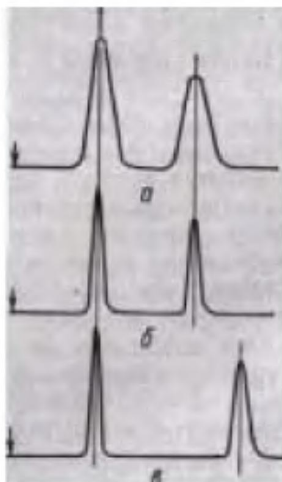


Рис. 1.1. Вид хроматограммы в зависимости от эффективности и селективности колонки: а — обычная селективность, пониженная эффективность (меньше теоретических тарелок), б — обычные селективность и эффек-тивность; в — обычная эффективность, повышенная селективность (больше отношение времен удерживания компонентов)

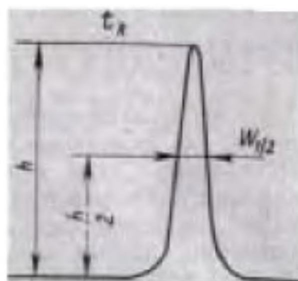


Рис. 1.2. Параметры хроматографического пика и расчет числа теоретических тарелок: t_R — время удерживания пика; h — высота пика; $W_{1/2}$ — ширина пика на половине его высоты

первоначально узкой полосы по мере прохождения ее через колонку, тем уже шик на выходе из колонки. ЧТТ характеризует число ступеней установления равновесия между подвижной и неподвижной фазами. ЧТТ легко определить по хроматограмме (рис. 1.2) последующей формуле:

$$N = 5{,}54(t_R / W_{1/2})^2$$

Зная число теоретических тарелок, приходящееся на колонку, и длину колонки L (мкм), а также средний диаметр зерна сорбента dc (мкм), легко получить значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), а также приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ПВЭТТ):

$$ВЭТТ = L / N \qquad ПВЭТТ = ВЭТТ / d_c$$

Имея значения ЧТТ, ВЭТТ и ПВЭТТ, можно легко сравнивать эффективность колонок разных типов, разной длины, заполненных разными по природе и зернению сорбентами. Сравнивая ЧТТ двух колонок одной длины, сравнивают их эффективность. При сравнении ВЭТТ сравнивают колонки с сорбентами одинакового зернения, имеющими разную длину. Наконец, величина ПВЭТТ позволяет для двух любых колонок оценить качество сорбента, во-первых, и качество заполнения колонок, во-вторых, независимо от длины колонок, зернения сорбента и его природы.

Селективность колонки играет большую роль в достижении хромато-графического разделения. Селективность колонки α определяется отношением приведенных времен удерживания двух пиков по следующему уравнению:

$$\alpha = (t_{R2}-t_0) / (t_{R1}-t_0)$$

где t_0 - время удерживания несорбируемого компонента; t_{R1} и t_{R2} - времена удерживания компонентов 1 и 2.

Селективность колонки зависит от очень многих факторов, и искусство экспериментатора в большой мере определяется умением воздействовать на селективность разделения. Для этого в руках хроматографиста находятся три очень важных фактора: выбор химической природы сорбента, выбор состава растворителя и его модификаторов и учет химической структуры и свойств разделяемых компонентов. Иногда заметное влияние на селективность оказывает изменение температуры колонки, меняющее коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

При рассмотрении разделения двух компонентов на хроматограмме и его оценке важным параметром является разрешение Rs, которое связывает времена выхода и ширину пиков обоих разделяемых компонентов (рис. 1.3):

$$R_S = 2\,(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Разрешение как параметр, характеризующий разделение пиков, увеличивается по мере возрастания селективности, отражаемой ростом числителя, и роста эффективности, отражаемой снижением значения знаменателя из-за уменьшения ширины пиков. Поэтому быстрый прогресс жидкостной хроматографии привел к изменению понятия «жидкостная хроматография высокого давления» — оно было заменено на «жидкостную хроматографию высокого разрешения» (при этом сокращенная запись термина на английском языке сохранилась HPLC как наиболее правильно характеризующее направление развития современной жидкостной хроматографии). Сокращение, принятое в отечественной литературе, — ВЭЖХ, расшифровываемое как «высокоэффектиная жидкостная хроматография», для современной жидкостной хроматографии несколько менее удачно, так как не учитывается важнейший фактор разделения — селективность.

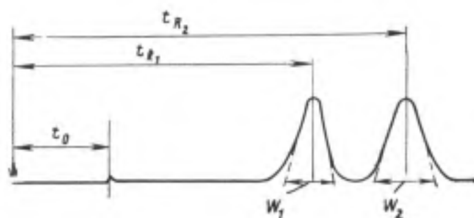


Рис. 1.2. Разрешение пиков и параметры удерживания

Важным параметром удерживания в жидкостной хроматографии является коэффициент емкости k', определяемый как частное от деления массы вещества в неподвижной фазе на массу вещества в подвижной фазе:

$$k' = m_н / m_п$$

Важное уравнение в жидкостной хроматографии, связывающее основные хроматографические параметры разделения следующее:

$$R_S = \tfrac{1}{4}\,[(\alpha - 1) / \alpha][k_2' / (1 + k_2')]\,\sqrt{N_2}$$

Разрешение, таким образом, определяется произведением трехсомножителей, первый из которых выражает зависимость от селективности колонки, второй — от коэффициента емкости колонки и третий — от эффективности колонки (ЧТТ).

Рассмотрим это важнейшее уравнение более подробно. Если, α=1, то разрешение равно 0, т.е. разделения нет независима от числа теоретических тарелок в колонке. Однако из характера функции α в уравнении видно, что небольшие изменения могут привести к заметному увеличению разрешения, особенно для тех случаев, когда значения α близки к 1. Если за счет подбора условий разделения удается изменить α с 1,1 до 1,2, это приводит к улучшению разрешения в два раза. Таким образом, на фактор селективности следует обращать основное внимание при подборе условий разделения, учитывая различие во взаимодействии разделяемых компонентов как в неподвижной, так и в подвижной фазе. В отличие от газовой хроматографии, в которой взаимодействия в подвижной (газовой) фазе незначительны и селективность системы в основном определяется только взаимодействиями веществ с неподвижной фазой, в жидкостной хроматографии подвижная (жидкая) фаза не является инертной, а может играть главную роль в процессе термодинамического распределения между неподвижной и подвижной фазами вследствие селективного взаимодействия разделяемых веществ с подвижной фазой. Поэтому в выборе условий для высокоселективного разделения как выбор